

令和元年6月4日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08963

研究課題名(和文) CLL希少地域である日本からの挑戦～確実な鑑別診断法の確立と分子病態の解明～

研究課題名(英文) Differential diagnosis of Japanese patients with CLL and related disorders

研究代表者

瀧澤 淳 (TAKIZAWA, JUN)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70463990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性リンパ性白血病(CLL)は西欧諸国で最も頻度の高い成人白血病であるが本邦では希少疾患である。本邦CLLの実態を解明するため全国調査研究CLLRSG-01を行い、登録症例を対象に細胞形態、免疫形質、FISH解析による染色体異常、IGHV遺伝子変異を解析した。自然乾燥標本を用いた形態観察により、162例がCLLであり、59例が他のB細胞腫瘍と診断された。しかし、免疫形質的にCLLと確認されたのは109例のみ(classic CLL)で、他の53例はCLLの診断基準を満たさなかった(CLL-like LPD)。本邦における典型的CLLの頻度が西欧諸国に比して低い可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性リンパ性白血病(CLL)は本邦において希少疾患であり、欧米と形態評価の方法が異なっていたため(欧米は自然乾燥なのに対して本邦は強制乾燥を用いる)、正確な実態は明らかにされていなかった。今回、欧米と同じ手法を用いて、国内多施設共同研究を行うことにより、初めて本邦CLLの実態が多数例で評価された。典型的形態と免疫形質を有するCLLの頻度が低いことが初めて明らかになり、非典型例が多数存在することが示された。今後、典型例と非典型例の分子病態を比較することにより、本邦に特徴的な発症機序が明らかになれば新規治療に結びつく可能性が高く、学術的意義や社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chronic lymphocytic leukemia (CLL), the most frequent adult leukemia in Western countries, is rare in Japan. To clarify the characteristics of Japanese patients with CLL, we conducted a nationwide registry study (CLLRSG-01). The WHO classification was used to establish a central diagnosis in all cases. Analyses of flow cytometry, FISH, and the mutational status of IGHV were performed. Morphologically 162 cases were classified as CLL and 59 as other B-cell neoplasms. Immunophenotypically, 109 of the 162 cases were confirmed as CLL (classic CLL), but the other 53 patients could not be attributed to a diagnosis of CLL (CLL-like LPD). The frequency of morphologically atypical CLL in the CLL-like LPD group was higher than that in the classic CLL group. Our analyses indicate that the proportion of Japanese patients with classic CLL is much lower among those with small mature B-cell neoplasms.

研究分野：血液内科学

キーワード：CLL CLLRSG-01 LEF1 Matutes' score Typical CLL Atypical CLL IGHV CLL-like LPD

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性リンパ性白血病(CLL)は欧米で最も多い白血病であるが、本邦における頻度は欧米の約1/10で極めて稀な造血器腫瘍である。本邦 CLL 多数例の前方視研究は皆無であり、その実態は明らかにされていない。そのため、我々は CLL および前リンパ球性白血病(PLL)、HCL、WM/LPL など類縁疾患を対象とした前方視登録研究(CLLRSG-01:UMIN00004915)を全国46施設と共同で行った。

(2) 同時期に、本邦における CLL 発症頻度が低いことに興味を抱いた欧州のグループ(ウーレン大学 Jaeger 教授ら)と国際共同研究を行うことに成功した。正確な相互比較を行うために双方の検査手技(標本作製、フローサイトメトリー(FCM)解析、FISH 解析など)を確認する harmonization 研究を行った。その過程で、欧米では塗抹標本を作成する際に自然乾燥の後に染色することが通常であるのに対して、本邦では冷風を用いた強制乾燥により標本を作成することが多いことが判明した。強制乾燥により細胞が大型で固定されるため、自然乾燥で成熟リンパ球と判断されるべき細胞が前リンパ球(prolymphocyte)や多形性(pleomorphic)細胞として数えられるため、非典型(atypical)CLL と判定される割合が欧米より多くなることがわかった。

#### 2. 研究の目的

(1) 本邦では CLL は稀な疾患であるが故に、鑑別上重要な類縁疾患(PLL、HCL、WM/LPL、脾辺縁帯 B 細胞リンパ腫(SMZL)など)と遭遇する機会も少なく、診断に難渋することが多い。CLLRSG-01 登録症例全例を対象に臨床情報、形態、および FCM 結果を解析して、CLL と類縁疾患との簡便な鑑別診断法を確立する。

(2) CLLRSG-01 の中間解析結果より、本邦の CLL は自然乾燥標本を用いて評価しても形態的 atypical CLL が約20%を占め、欧米の約10%に比べ多いことが判明した。CLLRSG-01 登録全症例を対象にして染色体分析・FISH 解析結果、および、免疫グロブリン可変領域遺伝子(*IGHV*)変異解析結果などを比較して、本邦における CLL の分子異常を明らかにする。欧米の既報と比較して本邦に特徴的な分子異常を見出す。

(3) CLLRSG-01 の中間解析結果より、CD5 や CD23 など CLL に特徴的な表面抗原を発現していないが、形態的には典型的な CLL としか言えない B 細胞腫瘍(CLL 様リンパ増殖症:CLL-like LPD)が多数存在することが明らかになった。CLL-like LPD と典型的 CLL を比較して、その違いを明らかにする。

#### 3. 研究の方法

(1) CLLRSG-01 登録例265例から同意撤回、標本不備、必要検査未提出などのため44例が検討対象から除外され、残る221例について最終診断を確定した。自然乾燥標本による形態中央診断、FCM 解析による免疫形質発現状況に加え、*CCND1* 転座解析、*BRAF* V600E 変異、*MYD88* L265P 変異など疾患に特徴的な分子異常について解析を行い、病理組織診断の結果も踏まえて類縁疾患の診断を明確にした。

(2) (1)の中で CLL と診断した症例について自然乾燥標本を用いた形態中央診断結果から typical CLL(T-CLL)と atypical CLL(A-CLL)とに分類し臨床情報、免疫形質、FISH 解析による染色体異常(*del*(13q14), *del*(17p13), *del*(11q22), trisomy 12)、*MYD88* L265P 変異、および、*IGHV*変異の有無と使用する遺伝子について比較検討した。

(3) 近年、病理組織を用いた免疫組織化学により CLL に LEF1(lymphoid-enhancer-binding factor 1)が高頻度かつ特異的に陽性となることが報告され(Tandon B, et al. Mod Pathol 24:1433, 2011)、診断的価値が期待されている。(1)の中で他の類縁疾患の診断基準は満たさず、かつ、CLL の免疫形質に当てはまらないが形態的には CLL としか言いようのない CLL-like LPD に該当する症例と、CLL と確定診断された症例の中で骨髄生検組織未染標本が得られたものを対象に、LEF1 染色を行い診断的価値を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 221例の中で CLL と最終診断されたのは109例(49%)であった。CLL 以外の類縁疾患は59例(27%)であり、その内訳は脾 B 細胞辺縁帯リンパ腫(SMZL)が12例、有毛細胞白血病(HCL)が10例、有毛細胞白血病亜型(HCL-v)が9例、リンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)が6例、マンテル細胞リンパ腫が5例、B 細胞前リンパ球性白血病(PLL)が4例、濾胞性リンパ腫(FL)が2例、びまん性赤脾髄小細胞型 B 細胞リンパ腫(SDRPL)が2例、分類不能な低悪性度 B 細胞腫瘍が9例であった。しかし、これら類縁疾患の診断基準に該当せず、形態的には CLL としか言いようがないが、免疫形質が CLL に当てはまらない症例(CLL-like LPD)が53例(24%)存在することが判明した(図1)。

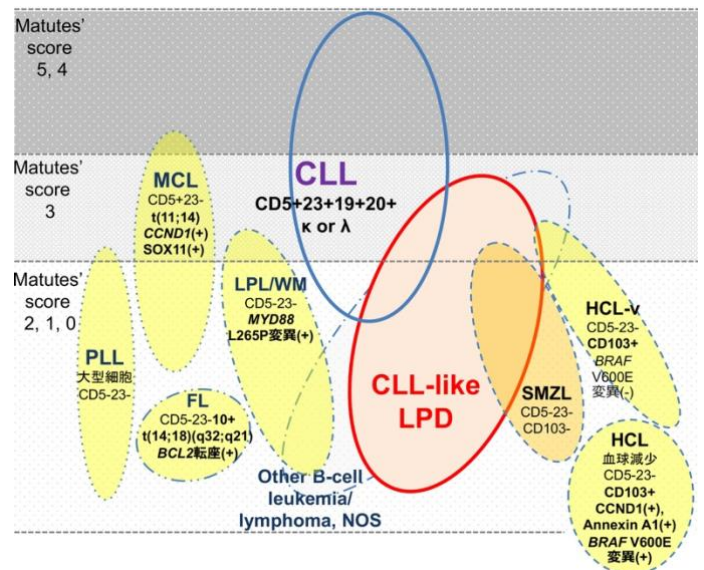
類縁疾患の中で HCL10例は自然乾燥法を用いた形態観察で典型的な全周性突起を認め、遺伝子解析により全例に *BRAF* V600E 変異を認めた。これらに関しては研究協力者の Itamura、Kimura

らが他の自験例と合わせて、その特徴を論文発表した(Int J Hematol 108: 416, 2018)。

(2) CLL 109 例について自然乾燥標本を用いた形態観察により、T-CLL は 82 例(75%)であり、A-CLL は 27 例(25%)であった。西洋諸国と同じ自然乾燥標本を用いても欧米における約 10%という頻度に比べ、我が国では A-CLL の頻度が多いことが明らかになった。T-CLL と A-CLL の間で、臨床的背景(年齢、性別、PS、病期、リンパ球数、LDH、 $\beta$ 2MG、sIL-2R)に有意差は認められなかった。免疫形質は A-CLL で Matutes' score 3 の症例が多く(p=0.007)、CD13 発現例が多い傾向(p=0.003)が認められた。しかし、FISH 解析による CLL に特徴的な del(13q14), del(17p13), del(11q22), trisomy 12 などの染色体異常の頻度には違いは認められなかった。IGHV 遺伝子変異の頻度も違いは認められなかった。

しかし、西洋諸国からの既報と比較して、IGHV 遺伝子変異例が 81%と多いことや、使用している IGHV 遺伝子の種類が異なり、1-69 など IGHV1 が極めて少ないことから、我が国の CLL の分子病態が異なる可能性が示唆され、iwCLL2017 にて報告した。

図 1

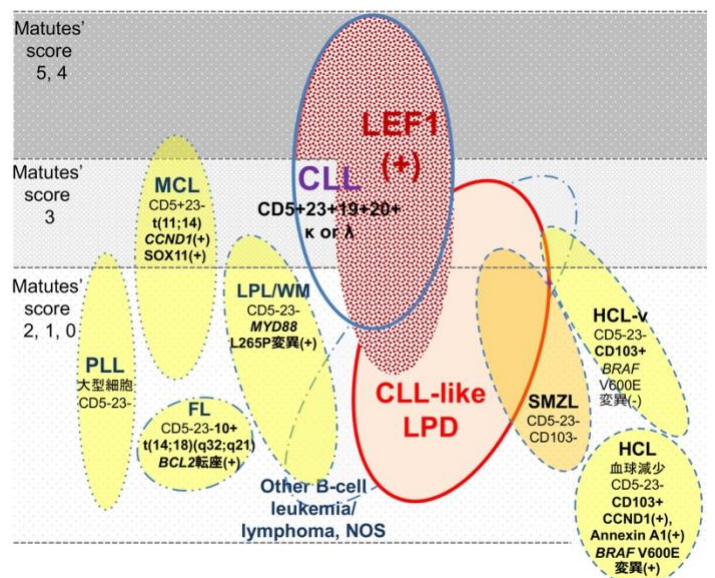


(3) 約 1/4 を占める CLL-like LPD の実態を明らかにするため、CLLRSG-01 登録例の中で骨髓生検組織未染標本が得られた症例を対象に免疫組織化学により LEF1 発現を確認した。

CD5 と CD23 が共に発現しており CLL と診断された中で、Matutes' score 5 または 4 の症例は全例 LEF1 陽性であったが、score 3 以下の 38 例中 LEF1 陽性は 23 例(61%)であり、約 4 割は LEF1 陰性であることが明らかになった(図 2)。また、CLL-like LPD とされた 16 例中 5 例(31%)が LEF1 陽性であることが示された(図 2)。

典型的な免疫形質を有する score 4 以上の CLL について LEF1 染色の診断的有用性が明らかにされたが、免疫形質が境界型の症例について LEF1 が有用であるかは今回の検討では明確にできなかった。今後、これらの症例を対象にして網羅的遺伝子解析を行い、分子基盤に違いがあるか明らかにすることが次期研究の課題である。

図 2



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Itamura H, Ide M, Sato A, Sueoka-Aragane N, Sueoka E, Nishida A, Masunari T, Aoki S, Takizawa J, Suzumiya J, Kimura S. Identification of the BRAF V600E mutation in Japanese patients with hairy cell leukemia and related diseases using a quenching probe method. Int J Hematol、査読有り、2018;108(4):416-422. doi: 10.1007/s12185-018-2506-3.
- ② 瀧澤 淳, 桐生 真依子, 河本 啓介 【慢性リンパ性白血病(CLL)と類縁疾患】慢性リンパ性白血病(CLL)と類縁疾患の鑑別診断 血液フロンティア 28: 179-185, 2018.
- ③ 瀧澤 淳 【臨床血液学-最新情報と今後の展望 2017(リンパ系疾患)-】慢性リンパ性白血病 病態解明の進歩と治療の現在 臨床血液、査読有、58 巻: 471-479, 2017、doi: 10.11406/rinketsu. 58. 471.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 瀧澤 淳, 鈴木 律朗, 伊豆津 宏二, 宇都宮 與, 木口 亨, 佐分利 能生, 竹内 賢吾, 中村 直哉, 大島 孝一, 青木 定夫, 鈴宮 淳司、CLL に類似した小型成熟 B 細胞性 LPD の特徴 (CLLRSG-01 研究)、第 79 回日本血液学会学術集会、2017 年
- ② Takizawa J, Suzuki R, Kiguchi T, Izutsu K, Asaoku H, Saburi Y, Masunari T,

Utsunomiya A , Takeuchi K, Nakamura N, Ohshima K, Aoki S, Suzumiya J.  
Characteristics of chronic lymphocytic leukemia in Japan (CLLRSG-01 study)、XVII  
International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (iwCLL2017)、2017年

- ③ 瀧澤 淳 シンポジウム5「リンパ腫の治療」本邦におけるCLLの治療～現状と今後の展望～、第57回日本リンパ網内系学会総会、2107年
- ④ 内山 孝由, 青木 定夫, 瀧澤 淳, 中村 直哉, 宇都宮 與, 伊豆津 宏二, 麻奥 英毅, 木口 亨, 大島 孝一, 鈴木 律朗, 鈴木 淳司、CD13 positive chronic lymphocytic leukemia -A distinct subset of CLL-, 第78回日本血液学会学術集会、2016年

〔図書〕(計3件)

- ① 瀧澤 淳 若年者マントル細胞リンパ腫の治療方針 EBM 血液疾患の治療 2019-2020 (金倉 譲、木崎昌彦、鈴木律朗、神田善伸編集) 中外医学社 pp.276-282, 2018.
- ② 瀧澤 淳 血液疾患の新規治療薬 2016 イブランチニブ Hematology AGORA 毘沙門堂 pp8-10, 2016 Summer

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：曾根 博仁

ローマ字氏名：Sone Hirohito

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号 (8桁)：30312846

研究分担者氏名：青木 定夫

ローマ字氏名：Aoki Sadao

所属研究機関名：新潟薬科大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8桁)：40242408

研究分担者氏名：鈴木 律朗

ローマ字氏名：Suzuki Ritsuro

所属研究機関名：島根大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：20280810

研究分担者氏名：大島 孝一

ローマ字氏名：Ohshima Koichi

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 50203766

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 鈴木 淳司

ローマ字氏名 : Suzumiya Junji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。